TOYOBO

2010 JUNE
VOL. 95

UPLOAD

KOD -Plus- Neo
→本誌p.4～6に詳細記事がございます。

特集

1 TOYOBO PCR関連試薬選択ガイド

HOT ITEM

4 高正確・高効率・高速PCR酵素
KOD -Plus- Neo

TECHNICAL REVIEW

5 高正確・高効率・高速PCR酵素『KOD -Plus- Neo』を用いたPCR増幅例

千種万様 USER'S NOTE

7 製品KOD FXを用いた実施例
KOD FXを用いた淡水産シオグサ属藻類（緑藻）のDNA断片増幅

HOT ITEM

9 高効率リアルタイムPCR用マスターミックス
THUNDERBIRD® qPCR Mix

TECHNICAL REVIEW

11 免疫反応促進試薬*Can Get Signal*® immunostainを用いた内在性Rab11の検出

INFORMATION

13 新カタログ発刊のご案内
13 価格改定のお知らせ
13 初代細胞ロット情報配信のご案内

みんなの広場

14 実験川柳特集11

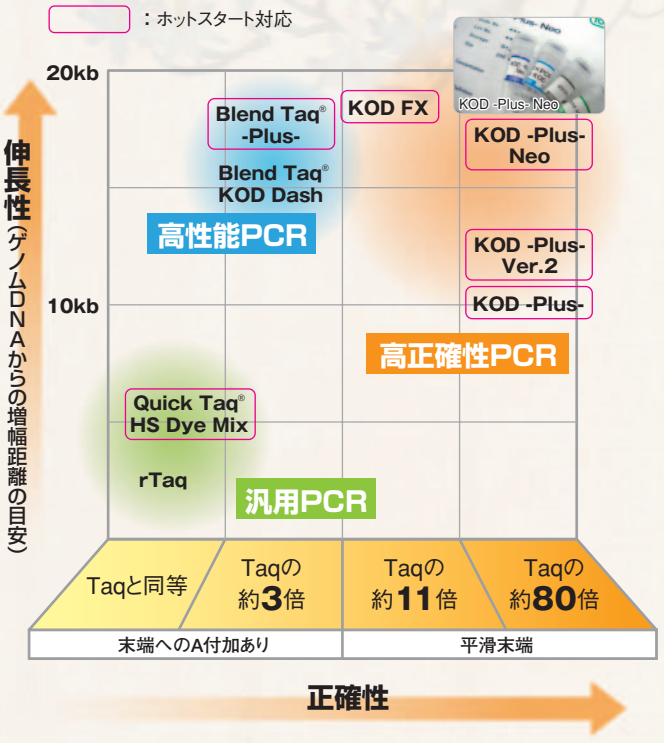
PCRは東洋紡

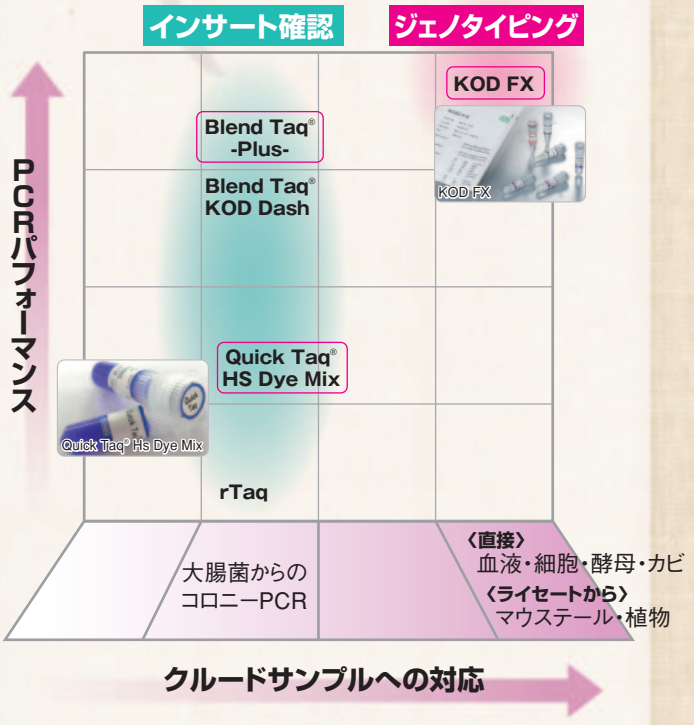
TOYOBO BIOCHEMICALS

TOYOBO
PCR関連試薬選択ガイド

1. PCR酵素選択マトリックス

弊社では様々な用途に適したPCR酵素をそろえております。下記のマトリックスを目安としてPCR酵素の選択にお役立てください。





2. PCR酵素の特長と使い分けの目安

用途によってPCR酵素を選択することによって、様々な実験をスムーズに進めることが可能です。以下に、大まかな使い分けの目安をお示しします。

クローニング用にDNA断片を正確に増幅したい。 KOD -Plus-シリーズ

cDNAやゲノムDNAからの遺伝子のクローニングやプラスミドからの遺伝子のサブクローニングなどに最適です。

品　名	正確性（対 Taq）	伸長性	増幅成功率	GCリッチ配列	クルードサンプル	伸長時間	末端	推奨TAクローニングキット
KOD -Plus-	約80倍	★★★	★★	★★★	★★	1min./kb	平滑	TArget Clone™ -Plus-
KOD -Plus- Ver.2	約80倍	★★★	★★★	★★★	★★	1min./kb	平滑	TArget Clone™ -Plus-
KOD -Plus- Neo	約80倍	★★★★	★★★★	★★★	★★	0.5min./kb	平滑	TArget Clone™ -Plus-

※全試薬ホットスタートに対応しています。

➡本号p4～6に関連記事がございます。

クルードサンプルを用いてジェノタイピングをしたい。難配列ターゲットを増幅したい。 KOD FX

マウステールや植物のクルードライセート、血液、酵母・カビコロニーなどからの高効率なジェノタイピングに最適です。
難配列ターゲットの増幅、夾雑DNAの多いサンプルからの増幅などに有効です。

品　名	正確性（対 Taq）	伸長性	増幅成功率	GCリッチ配列	クルードサンプル	伸長時間	末端	推奨TAクローニングキット
KOD FX	約11倍	★★★★	★★★★	★★★★	★★★★	1min./kb	平滑	TArget Clone™ -Plus-

※ホットスタートに対応しています。

➡本号p7・8に関連記事がございます。

高性能なPCRを行いたい。コストパフォーマンス重視。 混合型PCR酵素シリーズ

汎用性の高いPCR酵素です。校正活性を持たないPCR酵素をベースに、微量の校正活性を有するPCR酵素を混合することによって優れた伸長性を示します（混合型PCR酵素）。KOD Dashは高速PCRに適しています。

品　名	正確性（対 Taq）	伸長性	増幅成功率	GCリッチ配列	クルードサンプル	伸長時間	ホットスタート	末端
Blend Taq®	約3倍	★★★★	★★	★★	★★	1min./kb	-	A付加
Blend Taq® -Plus-	約3倍	★★★★	★★★★	★★	★★	1min./kb	○	A付加
KOD Dash	約3倍	★★★★	★★★	★★★	★★	0.5min./kb	-	A付加

汎用的にPCRを行いたい。 Taqシリーズ

rTaq DNA polymerase…… スタンダードなPCR酵素です。
Quick Taq® HS DyeMix…… 色素混合タイプの2xプレミックス試薬であり、ホットスタートにも対応しています。インサートチェックなどに最適です。コストパフォーマンスに優れます。

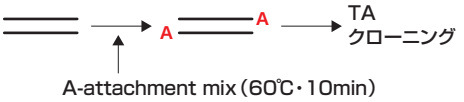
3. TAクローニングキットの選択

弊社では通常のTAクローニングキットに加え、KODシリーズで増幅された平滑末端PCR産物をTAクローニングするための専用キットをご用意しております。

A付加されたPCR産物 ➡ **TArget Clone™**

KODシリーズで増幅した平滑末端PCR産物 ➡ **TArget Clone™ -Plus-**

（KOD -Plus-シリーズ、KOD FX、KOD DNA Polymerase）

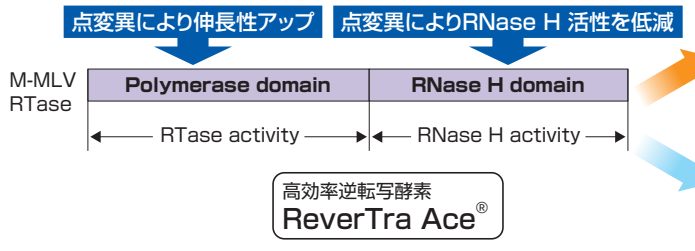


A-attachment mix（60℃・10min）
・抗KOD pol.抗体（KOD活性の抑制）
・Taq pol.（TdT活性による末端へのA付加）

図1. TArget Clone™ -Plus-の原理

4. 逆転写酵素・キットの選択

弊社では自社開発の高効率逆転写酵素「ReverTra Ace®」を用いた2種類のcDNA合成キットを供給しています。用途に応じて使い分けることにより、より効率的なPCR実験を行うことができます。



高効率逆転写酵素
ReverTra Ace®

RT-PCR用cDNA合成

・Oligo dT、およびRandomプライマーを含みます。
・長鎖（～10kb）の伸長に最適です。

高効率cDNA合成キット
ReverTra Ace -α-®

リアルタイムPCR用cDNA合成

・Oligo dT,とRandomのミックスプライマーを含みます。
・リアルタイムPCR用のcDNA合成に最適です。

リアルタイムPCR用高効率cDNA合成キット
ReverTra Ace® qPCR RT Kit

5. リアルタイムPCR試薬の選択

弊社では様々なリアルタイムPCR試薬を揃えております。用途に応じて選択することで実験を効率的に進めることができます。

品　名	タイプ	アッセイタイプ	感度	特異性	簡便さ	コスト パフォーマンス
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	2ステップ	SYBR® GREEN	★★★★	★★★	★★	★★★★
THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	2ステップ	TaqMan®	★★★★	★★★★	★★	★★★★
RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	1ステップ (RNAから直接)	SYBR® GREEN	★★★★	★★★	★★★★	★★★
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix	1ステップ (RNAから直接)	TaqMan®	★★★★	★★★★	★★★★	★★★

※全試薬ホットスタートに対応しています。

➡THUNDERBIRD®に関しまして本号p9・10に関連記事がございます。

6. 価格表

保存温度:-20℃

品　名	包　装	Code No.	価　格
PCR酵素			
KOD -Plus-	200U×1本(200回用)*	KOD-201	¥30,000
	(200U×1本)×5	KOD-201X5	¥120,000
	(200U×1本)×10	KOD-201X10	¥210,000
KOD -Plus- Ver.2	200U×1本(200回用)*	KOD-211	¥30,000
	(200U×1本)×5	KOD-211X5	¥120,000
KOD -Plus- Neo	200U×1本(200回用)*	KOD-401	¥30,000
	(200U×1本)×5	KOD-401X5	¥120,000
KOD FX	200U×1本(200回用)*	KFX-101	¥35,000
Blend Taq®	250U×1本(200回用)*	BTQ-101	¥19,000
	(250U×1本)×5	BTQ-101X5	¥76,000
	(250U×1本)×10	BTQ-101X10	¥133,000
Blend Taq® -Plus-	250U×1本(200回用)*	BTQ-201	¥21,000
	(250U×1本)×5	BTQ-201X5	¥84,000
KOD Dash	250U×1本(100-200回用)*	LDP-101	¥25,000
	(250U×1本)×5	LDP-101X5	¥100,000
	(250U×1本)×10	LDP-101X10	¥180,000
Quick Taq® HS DyeMix	100回用*	DTM-101	¥9,800
	1,000回用*	DTM-101X10	¥44,000
rTaq DNA polymerase	250U×1本(100-200回用)*	TAP-201 (Mg別添タイプ)	¥9,500
		TAP-211 (Mg含有タイプ)	¥9,500
TAクローニングキット			
TArget Clone™	10回用	TAK-101	¥12,000
TArget Clone™ -Plus-	10回用	TAK-201	¥16,000
TAクローニング用A付加試薬 10XA-attachment Mix	25μl×1本(25回用)	TAK-301	¥12,000
cDNA合成試薬			
ReverTra Ace®	10,000U×1本	TRT-101	¥17,000
	(10,000U×1本)×5	TRT-101X5	¥68,000
	(10,000U×1本)×10	TRT-101X10	¥119,000
ReverTra Ace -α-®	100回用	FSK-101	¥53,000
ReverTra Ace® qPCR RT Kit	200回用	FSQ-101	¥38,000
リアルタイムPCR			
THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix	1.67 ml×3本	QPS-101	¥29,000
	(1.67 ml×3本)×5	QPS-101X5	¥133,000
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix	1.67 ml×3本	QPS-201	¥29,000
	(1.67 ml×3本)×5	QPS-201X5	¥133,000
RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix	0.5 ml×5本	QRT-101	¥33,000
	(0.5 ml×5本)×5	QRT-101X5	¥150,000
RNA-direct™ SYBR® Green Realtime PCR Master Mix	0.5 ml×5本	QRT-201	¥33,000
	(0.5 ml×5本)×5	QRT-201X5	¥150,000

*50μl 反応時の使用回数を表示しています。

TOYOBO

高正確・高効率・高速PCR酵素

KOD -Plus- Neo

➡本号p5・6に関連記事がございます。

サイクル後半での増幅の鈍化を改善。伸長時間短縮(30sec./kb)で理想的なクローニング用PCRを実現。

KOD DNA Polymeraseは、強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性(校正活性)を有し、正確にターゲット配列を増幅することができるため、クローニング用のPCR酵素として好評いただいております。しかし、高正確性PCR酵素は、20~30サイクル以降、増幅が持続しなくなる〈プラトー現象〉が出やすいと言われています。KOD -Plus-Neoは、高正確性PCR酵素: KOD -Plus-シリーズの技術に新たに開発した「伸長エンハンサー」を応用することでTaqの約80倍というKOD -Plus-シリーズの高い正確性を保持しつつ、〈プラトー現象〉を抑えることにより、微量な鋳型DNAからの増幅や長いターゲットの増幅効率を格段に向上させることに成功しました。

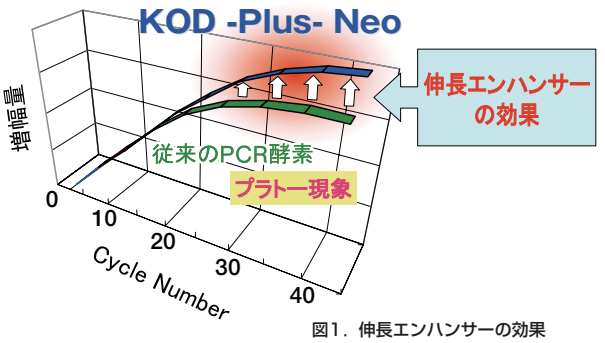


図1. 伸長エンハンサーの効果

特長1 微量な鋳型DNAから正確・高効率な増幅が可能

・伸長エンハンサーを応用することによって、微量な鋳型DNAからでも高正確・高効率に目的遺伝子を増幅することができるようになりました。本酵素は高い正確性(Taqの約80倍)を示し、低コピー数の鋳型からも正確に目的遺伝子を増幅することができます。

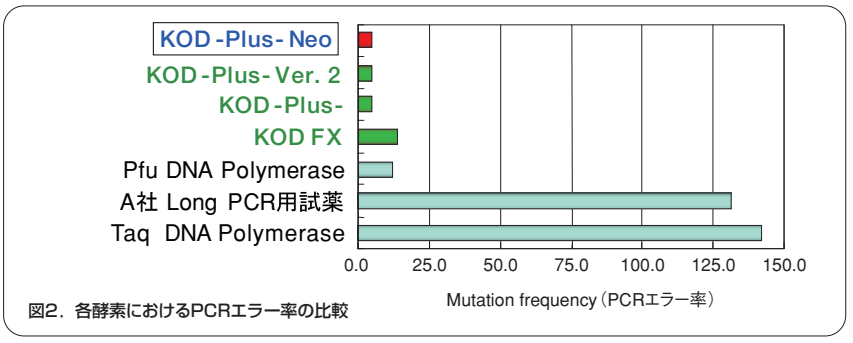


図2. 各酵素におけるPCRエラー率の比較

特長2 増幅時間を短縮〈30sec./kb〉(長いターゲットでより便利になりました)

・伸長時間を、従来品の60sec./kbから30sec./kbに短縮。

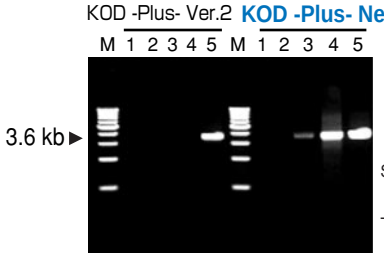


図3. 様々な伸長時間における増幅効率の比較

【サイクル条件】
94℃, 2min.
98℃, 10sec. ←30 cycles
68℃, X

伸長時間X:
1: 18sec. (5sec./kb)
2: 36sec. (10sec./kb)
3: 54sec. (15sec./kb)
4: 108sec. (30sec./kb)
5: 216sec. (60sec./kb)
M: 1kb DNA Ladder

特長3 幅広いターゲットの増幅

・従来品より伸長性が向上し、様々な長さのターゲットを増幅できます。ゲノムDNAで24kbまでの増幅を確認しています。

特長4 様々なプライマーで同一温度サイクル条件を実現

・検討不要のサイクル条件を実現しました。20mer以上のプライマー(Tm値>63℃)*においては、まずは2ステップサイクルをお試しください。検討要らずで簡単です。

*Tm値は最近接塩基対法(Nearest Neighbor method)を用いて計算した値を利用しています。

品名および内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
高正確・高効率・高速PCR酵素 **KOD -Plus- Neo** KOD -Plus- Neo (1U/μl) 10×Buffer for KOD -Plus- Neo 2mM dNTP 25mM $MgSO_4$	200U×1本[200回用]*	-20℃	KOD-401	¥30,000
	(200U×1本)×5[1,000回用]*	-20℃	KOD-401X5	¥120,000

*50μl反応を行ったときの反応回数で表示しています。

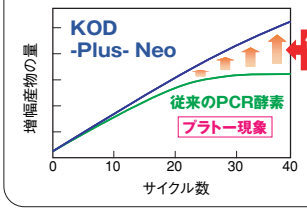
高正確・高効率・高速PCR酵素『KOD -Plus- Neo』を用いたPCR増幅例

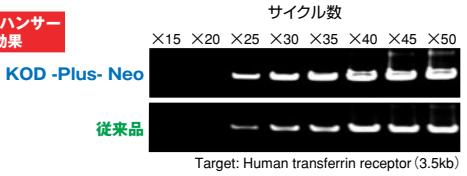
東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　小林 哲大

はじめに

『KOD -Plus- Neo』は、『KOD DNA Polymerase』に弊社独自の技術である『伸長エンハンサー』を添加することにより開発されたPCR酵素です。従来の『KOD -Plus-』シリーズの優れた正確性（Taqの約80倍）はそのままに、増幅量や伸長性を格段に向上させています。そのため、『KOD -Plus- Neo』を用いることにより、レアな遺伝子や長いターゲットを正確かつ確実に、増幅することが可能です。また、『KOD -Plus- Neo』では、伸長反応を従来の1min./kbから30sec./kbに短縮することができるため、PCRに要する時間を大幅に短縮することが可能です。

伸長エンハンサーの効果





Target: Human transferrin receptor（3.5kb）

KOD DNA Polymeraseをはじめ高正確性PCR酵素は、20～30サイクル以降、増幅が持続しなくなる〈プラトー現象〉が出やすいと言われていました。KOD -Plus- Neoは、伸長エンハンサーの技術を応用することによりプラトー現象を抑えることに成功しています。サイクル後半まで反応を持続させることにより大幅に増幅量が向上します。

今回は、この『KOD -Plus- Neo』を用いて、従来品や他社の高正確性酵素と比較を行いました。以下に、その方法及び結果をご紹介いたします。

方　法

(1)テンプレート

PCRのテンプレートにはHuman genomic DNA、またはHeLa Total RNAから調製したcDNA（弊社のReverTra Ace -α-®；Code No. FSK-101を用いて調製）を使用しました。

(2)PCR反応

PCR反応は、以下の条件にて実施しました。

①反応液組成

PCR grade water	32	μl
10×PCR buffer for KOD -Plus- Neo	5	μl
2 mM dNTPs	5	μl
25 mM $MgSO_4$	3	μl
10 pmol /μl Primer #1	1.5	μl
10 pmol /μl Primer #2	1.5	μl
50 ng Human Genomic DNA（実施例1） or 0.5 ng（RNA相当量）/μl cDNA（実施例2）	1	μl
KOD -Plus- Neo（1.0 U/μl）	1	μl
Total reaction volume	50	μl

②PCRサイクル

94℃,　2 min.
98℃, 10 sec.　◀┐30 cycles（実施例1）or
68℃, 30 sec./kb　┘40 cycles（実施例2）

※KOD -Plus- Neoは上記の2ステップサイクルに至適化されています。Tm値が63℃以上の場合は2ステップサイクルを実施してください。

94℃,　2 min.
98℃, 10 sec.　◀┐5 cycles
74℃,　9 min.　┘
98℃, 10 sec.　◀┐5 cycles
72℃,　9 min.　┘
98℃, 10 sec.　◀┐5 cycles
70℃,　9 min.　┘
98℃, 10 sec.　◀┐20 cycles
68℃,　9 min.　┘
（実施例1　Human β-globin 17.5kbの増幅のみ）

※長鎖長増幅の場合は、上記のステップダウンのサイクルを行うことで増幅量が増えることがあります。

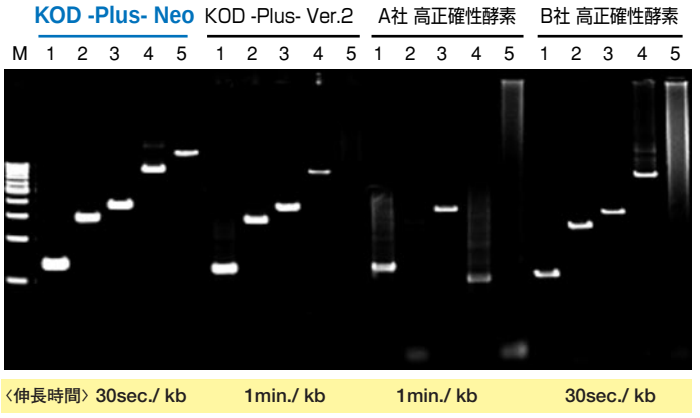
他の高正確性PCR酵素は取扱説明書推奨の条件にてPCRを実施し、比較を行いました。

		Target	増幅サイズ	配　列	長さ	Tm（℃）	GC%
実施例1	1	Human β-globin	1.3 kb	#1: TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC	22 mer	66.2	54.5
				#2: CCAGGATTTTTGATGGGACACG	22 mer	69.2	50.0
	2	Human β-globin	2.7 kb	#1: GCTGCTCTGTGCATCCGAGTGG	22 mer	73.5	63.6
				#2: CCAGGATTTTTGATGGGACACG	22 mer	69.2	50.0
	3	Human β-globin	3.6 kb	#1: GGTGTTCCCTTGATGTAGCACA	22 mer	65.9	50.0
				#2: ACATGTATTTGCATGGAAAACAACTC	26 mer	65.5	34.6
	4	Human β-globin	8.5 kb	#1: TGATAGGCACTGACTCTCTGTCCCTTGGGCTGTTT	35 mer	79.6	51.4
				#2: ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA	35 mer	76.9	45.7
	5	Human β-globin	17.5 kb	#1: TGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC	35 mer	77.5	48.6
				#2: ACATGATTAGCAAAAGGGCCTAGCTTGGACTCAGA	35 mer	76.9	45.7
実施例2	1	Human transferrin receptor	3.5 kb	#1: CCACCATCTCGGTCATCAGGATTGCCT	27 mer	77.2	55.6
				#2: TACTCCTTAACGAGAAGACATCTCAAGAC	29 mer	65.6	41.4
	2	Human Tuberous scleosis	5.3 kb	#1: GGAGTTTATCATCACCGCGGAAATACTGAGAG	32 mer	74.2	46.9
				#2: TATTTCACTGACAGGCAATACCGTCCAAGG	30 mer	74.2	46.7
	3	Human adaptin	5.7 kb	#1: ACCATCTTTGTCCCTGGCAAAGTGG	25 mer	73.2	52.0
				#2: GACGAAGACACAAGGTCAAGCTTCC	25 mer	69.8	52.0
	4	Human polymerase ε	6.8 kb	#1: CACTTCCTCAGTTTCGGCACTCAAGCG	27 mer	76.2	55.6
				#2: CTTCTGCAGCAGCCACTCCAGGGTCTC	27 mer	77.6	63.0

※ プライマーは22～35mer（Tm値＞63℃）で設計してください。長めのプライマーを用いることで特異性があがり、PCR成功率が向上することがあります。

結果及び考察

実施例1　様々なサイズの遺伝子を増幅した増幅量・伸長性の評価

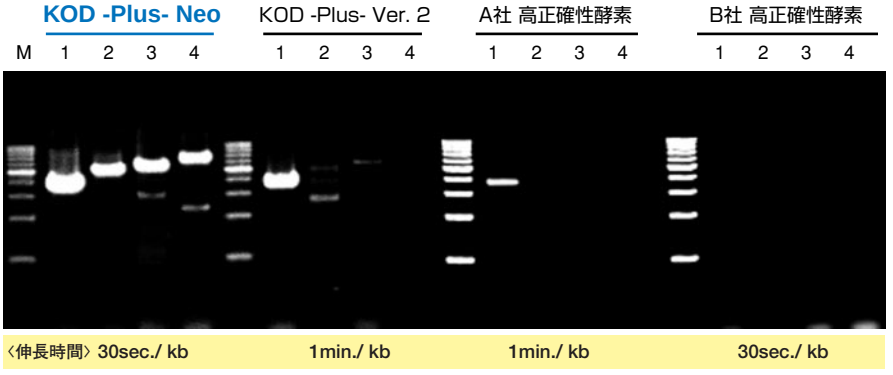


1: Human β-globin 1.3kb
2: Human β-globin 2.7kb
3: Human β-globin 3.6kb
4: Human β-globin 8.5kb
5: Human β-globin 17.5kb
M: 1kb DNA Ladder

Human β-globin遺伝子をターゲットとし、様々なサイズの増幅を試みました。PCR産物を、1%アガロースゲルに5μlアプライして解析を行った結果、KOD -Plus- Neoのみ、17.5 kbまでの明瞭な増幅を確認することができました。

また、17.5kb以下の増幅においても、他の高正確性酵素を上回る収量が確認され、KOD -Plus- Neoが増幅量・伸長性共に最も優れていることが示されました。 KOD -Plus- Neoを用いれば、正確にかつ他の高正確性酵素では伸長できない長いターゲットの増幅が可能になると考えられます。

実施例2　微量テンプレートを鋳型とした増幅効率の評価



1: Human transferrin receptor (3.5kb)
2: Human Tuberous scleosis (5.3kb)
3: Human adaptin (5.7kb)
4: Human polymerase ε (6.8 kb)
M: 1kb DNA Ladder

cDNA 0.5ng (RNA相当分) を用いて4種類の遺伝子を増幅し、増幅効率を比較しました。PCR条件は40サイクルにて増幅を行い、PCR産物を、1%アガロースゲルに5μlアプライして解析を行いました。その結果、KOD -Plus- Neoのみ4種類の遺伝子すべてについて、微量テンプレートから効果的な増幅を確認でき、5kb以上の長鎖ターゲットにおいても優れた増幅効率を持つことが示されました。

KOD -Plus- Neoは通常より多めのサイクル数をかけることが可能であるため、他の高正確性酵素では不可能だったレア遺伝子等の微量のテンプレートからの増幅に利用することができます。

まとめ

KOD -Plus- Neoは、他の高正確性酵素に比べ、増幅量が多く、伸長性も大幅に向上しています。クローニングをはじめ高い正確性が必要な場面で、増幅が見られない、増幅が少ないといった問題解決にはぜひ、KOD -Plus- Neoを一度お試しください。

品名および内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
高正確・高効率・高速PCR酵素 **KOD -Plus- Neo** KOD -Plus- Neo (1U/μl) 10×Buffer for KOD -Plus- Neo 2mM dNTP 25mM $MgSO_4$	200U×1本 [200回用*]	-20℃	KOD-401	￥30,000
	(200U×1本)×5 [1,000回用*]	-20℃	KOD-401X5	￥120,000

*50μl反応を行ったときの反応回数で表示しています。

製品 KOD FX を用いた実施例

KOD FXを用いた淡水産シオグサ属藻類（緑藻）のDNA断片増幅

データご提供　福井県立大学 海洋生物資源学部　神谷充伸先生

現在、当研究室では汽水湖におけるシオグサ属藻類（緑藻）の多様性の研究を行っている。その一環として、天然藻体を用いたダイレクトシークエンスを行っているが、その際にはPCRによるDNAの増幅が不可欠である。サンプルとして用いているシオグサ属藻類は多糖類を多く含むことが知られており、これらはPCRにおいてDNAポリメラーゼの酵素反応を阻害する可能性があると考えられている。そのため、これまではテンプレートとなるDNA抽出の際には多糖およびタンパク質を比較的効率よく除去できるとされるCTAB法を用い、PCRはA社高効率Taqを用いてDNAの増幅を行ってきた。しかし、高塩濃度域から採集してきた個体に関しては問題なく増幅が見られたものの、低塩濃度および淡水域から採集してきた個体に関してはこれまでの方法ではPCRによる増幅が殆ど見られなかった。そのため、CTAB法以外のDNA抽出、フェノール / クロロホルム法等によるDNAの精製、nested PCRおよびプライマーの配列や組み合わせに関する試行錯誤を繰り返してきたがこれといった成果は上がらなかった。そこで、本実験では高い正確性と増幅率を持つとされるKOD FXを用いて、淡水域に生育するシオグサ属藻類のDNA断片の増幅およびこれまで増幅の見られなかった原因の模索を目的とした。

実験方法

サンプル　淡水産シオグサ属藻類

サンプルの処理　抽出：CTAB法

遺伝子名　rRNA遺伝子のITS領域

ターゲット長　約700～1200bp

プライマーの設定位置

図1.　プライマーの位置情報

PCRの際に用いたプライマーの位置情報を示す。1回目のPCRの際にはA,Bのプライマー対を用い、nested PCRの際にはC、Dのプライマー対を用いた。　Primer A: 29 mer, Primer B: 23 mer, Primer C: 22 mer, Primer D: 20 mer。

反応液組成

A社高効率Taq		KOD FX	
滅菌水	34.8 μl	滅菌水	9.0 μl
10×buffer	5.0 μl	2×buffer	25.0 μl
2.5 mM dNTP	4.0 μl	2 mM dNTP	10.0 μl
プライマー (10μM)	各2.0 μl	プライマー (10μM)	各1.5 μl
高効率Taq	0.2 μl	KOD FX	1.0 μl
DNA溶液	2.0 μl	DNA溶液	2.0 μl

PCRサイクル

・A社高効率Taq

94℃, 2 min.
↓
94℃, 30 sec.
63 or 66℃, 30 sec.
72℃, 1 min.
} 30 cycles
↓
72℃, 5 min.

・KOD FX

94℃, 2min.
↓
98℃, 10 sec.
65℃, 30 sec.
68℃, 2 min.
} 30 cycles

結　果

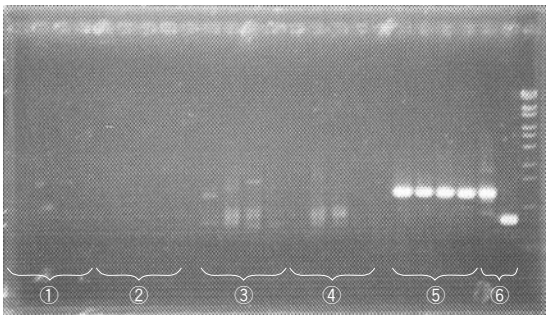


図2.　PCR産物の泳動結果
PCR産物は各レーンに2.5μlずつ流した。図2の①～⑥はPCRの条件を示し（表1）、①, ②はA社高効率Taqを用いた通常のPCR 、③, ④は①のPCR産物をテンプレートにしたnested PCR、⑤はKOD FXを用いたPCR、⑥は過去にA社高効率Taqで増幅の見られたサンプルのDNA抽出液を用いたポジティブコントロールを示す。

テンプレート	ポリメラーゼ	プライマー	アニーリング温度	PCR産物
DNA抽出液	A社高効率Taq	A, B	63℃	①
DNA抽出液	A社高効率Taq	A, B	66℃	②
②	A社高効率Taq	C, D	63℃	③
②	A社高効率Taq	C, D	66℃	④
DNA抽出液	KOD FX	A, B	65℃	⑤
DNA抽出液	KOD FX	A, B および C, D	65℃	⑥

表1.　PCRの条件
5通りの条件でPCRを行い、各条件のPCR産物に番号（①～⑥）を振った。⑥は過去にA社高効率Taqで増幅の見られたDNA抽出液を用いたポジティブコントロール。

今回は4個体に対して、A社高効率Taq・プライマーA,Bを用いたPCR（アニーリング温度63,66℃）、アニーリング温度66℃で行ったPCR産物をテンプレートにして、A社高効率Taq・プライマーC,Dを用いたnested PCR（アニーリング温度63,66℃）およびKOD FX・プライマーA,Bを用いたPCRを行い、計20サンプル（4個体×5通り）の実験を行った。（表1）

その結果、A社高効率Taqを用いた通常のPCRでは増幅が殆ど観察されず（図2 ①,②）、nested PCRでは全体的にスメアとなり、目的の断片の増幅が見られなかった（図2 ③,④）。しかし、KOD FXを用いたPCRでは目的の断片の増幅が見られた（図2 ⑤）。

先生からのコメント

今回の実験から、KOD FXは今まで増幅の見られなかった淡水産シオグサのDNA増幅に効果があることが示された。シークエンシングの結果、今まで低塩濃度・淡水域から採集された個体には2種のシオグサ属藻類が含まれていることが判明し、そのうち淡水産として記載されている1種の個体においてのみPCRによる増幅が見られなかったことが判明した。また、海産の種に関しては今までに問題なくPCRでの増幅が見られていたことから、淡水産種と海産種という分布域の違いにより体内に含まれる何らかの物質の有無もしくは量の差があり、それによって増幅の可否が決まっていた可能性が考えられた。KOD FXを用いるまでは、低塩濃度域特有の微細生物のコンタミ・プライマー配列が一致していない等の問題も考えられたが、今回の結果から前者はKOD FXを用いる際には問題ないと判断され、後者に関しては棄却された。また、後日パンフレットに「植物（葉、精米）ライセートからの増幅例」として紹介されていたワンステップ法を用いたPCRも行ってみたが、こちらは増幅が見られたものと見られないものがあった。（データ未掲載）。そのため、ワンステップ法に関してはサンプル数を増やし、もう少し試行錯誤を行う必要があると考えられる。

以上のことから、不純物がかなり多い場合には増幅に支障が出るが、ある程度の純度があればA社高効率Taqと比べると非常に高い増幅効率を示すことが示唆された。

高成功率PCR酵素　**KOD FX**

包　装	Code No.	価格
200U ×1本	KFX-101	¥35,000
(200U ×1本) ×5	KFX-101X5	¥140,000
(200U ×1本) ×10	KFX-101X10	¥260,000

KOD FXは、マウステールライセート、植物ライセート、血液など様々なクルードサンプルから直接、高効率なPCRを行うことができます。
実施例は弊社ウェブサイト（http://www.toyobo.co.jp/bio）KOD FXコーナーで公開しております。是非一度ご覧ください。

高効率リアルタイムPCR用マスターミックス

THUNDERBIRD® qPCR Mix
サンダーバード

特異性、ダイナミックレンジ、コストパフォーマンスに優れたリアルタイムPCR試薬です。

THUNDERBIRD® qPCR Mixは、Taq DNA polymeraseをベースとして開発された、高効率リアルタイムPCR用マスターミックス（2×濃度）です。本製品は、新規エンハンサーの採用を含め、組成を根本的に見直すことによって、反応特異性とPCR効率が飛躍的に向上しています。これらの改良によって、幅広い定量可能域（ダイナミックレンジ）を実現しました。また、実験のランニングコストを大幅におさえることが可能になりました。

特長1 高い特異性（プライマーダイマーの低減）

・組成の最適化により、PCRの特異性が向上。非特異反応の低減によって、SYBR® Green Ⅰ、およびTaqMan®アッセイにおいて、低コピー数のターゲットの検出感度が向上しました。

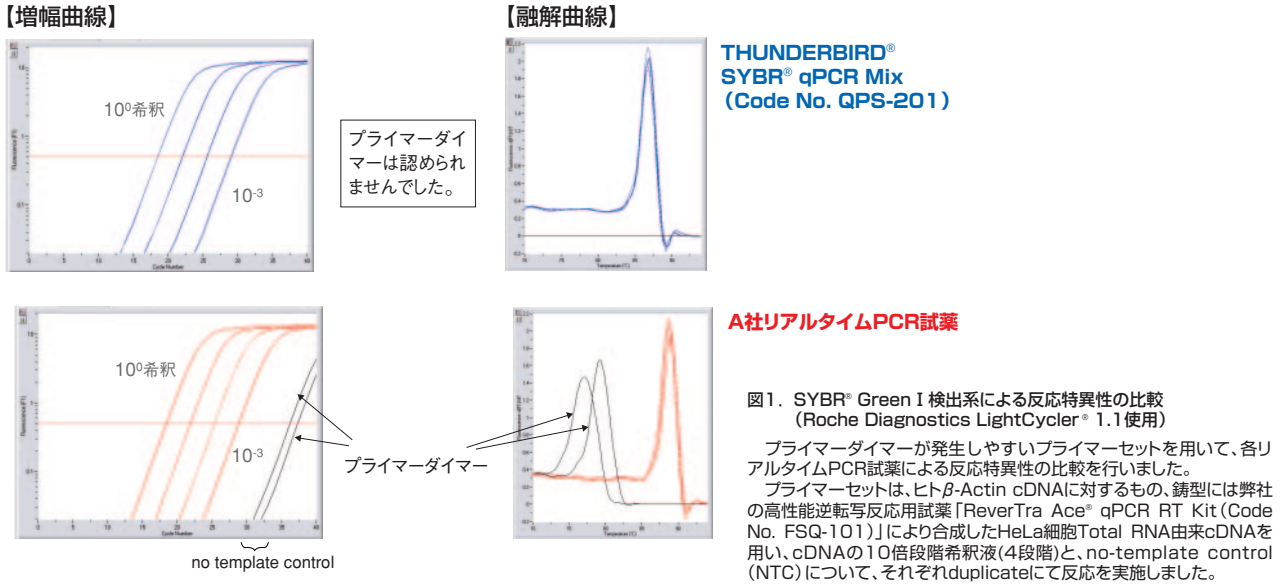


図1．SYBR® Green Ⅰ検出系による反応特異性の比較
（Roche Diagnostics LightCycler® 1.1使用）

プライマーダイマーが発生しやすいプライマーセットを用いて、各リアルタイムPCR試薬による反応特異性の比較を行いました。
プライマーセットは、ヒトβ-Actin cDNAに対するもの、鋳型には弊社の高性能逆転写反応用試薬「ReverTra Ace® qPCR RT Kit（Code No. FSQ-101）」により合成したHeLa細胞Total RNA由来cDNAを用い、cDNAの10倍段階希釈液（4段階）と、no-template control（NTC）について、それぞれduplicateにて反応を実施しました。

特長2 様々なターゲットを均一に検出

・ターゲットごとのPCR効率のばらつきを最小限に抑える効果のある新規エンハンサーを採用。*

＊特許出願中

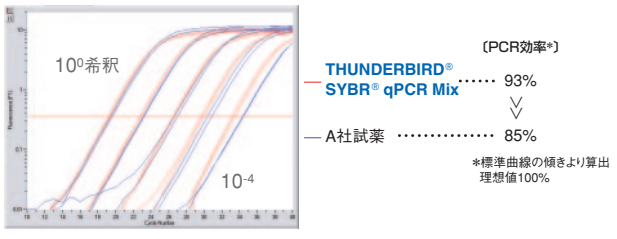


図2．SYBR® Green Ⅰ検出系によるノロウイルスGI cDNAの検出
（縮合プライマー使用）（Roche Diagnostics LightCycler® 1.1使用）

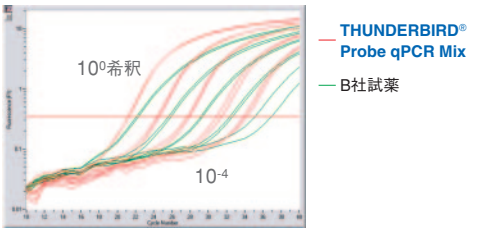


図3．TaqMan® 検出系によるGAPDH cDNAの定量
（Roche Diagnostics LightCycler® 1.1使用）

特長3 広いレンジで検出可能

・特異的（特長1）、かつ高効率（特長2）な増幅により、広い測定レンジでの解析が可能になりました。

特長4 様々な機器に対応

・一般的なブロックタイプの機器（Fast Modeにも対応）のほか、ガラスキャピラリーを用いる高速サイクラーにも対応しています。また、50× ROX reference dyeが別添付されているため、パッシブリファレンスを使用する機器（Applied Biosystems社製機器、Stratagene社製機器など）においても、各機種の特性に応じた最適なROX濃度でご使用いただけます。

表　代表的な対応機器

Applied Biosystems	ABI PRISM 7000
	ABI PRISM 7700
	Applied Biosystems 7300
	Applied Biosystems 7500
	Applied Biosystems 7500 Fast
	Applied Biosystems 7900HT
	Applied Biosystems Step One™
Roche Diagnostics	LightCycler 1.x
	LightCycler 2.0
	LightCycler 480

Bio-Rad/MJ	iCycler iQ
Stratagene	Mx3000P
	Mx3005P
TaKaRa	Thermal Cycler Dice
BioFlux	Line Gene

※リスト中Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, Stratagene Mx3000P, Mx3005Pをご使用の場合のROX reference dyeの最適濃度は、最終濃度0.1×（1/500量添加）となります。その他は1×（1/50）濃度を推奨します。

特長5 高速ホットスタート

・抗Taqポリメラーゼ抗体を用いるホットスタートシステムを採用しています。抗体は加熱により速やかに失活するため、最初の変性時間を短時間に設定できます。

特長6 高いコストパフォーマンス

・実験のランニングコストを大幅におさえることが可能になりました。

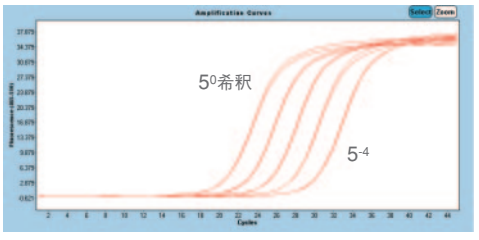
実施例 Roche LightCycler® 480での使用例

HeLa細胞のTotal RNAから調製したcDNA を鋳型として、ヒトGAPDH遺伝子（85bp）の増幅をRoche LightCycler® 480で実施しました。その結果、弊社条件で使用することで、良好な結果を得ることができました。

【反応条件】

・**Template**：cDNA from HeLa total RNA（ReverTra Ace® qPCR RT Kit [FSQ-101] 使用　5倍希釈系列　5水準　N=2）
・**Target**　：GAPDH（85bp）
・**使用機器**　：LightCycler® 480 System Ⅱ
・**反応液量**　：20μl
・**反応サイクル**：弊社推奨条件: 95℃, 1min.→（95℃, 15sec.→60℃, 1min.）×45cycles
（※本機器の使用につきましては、以下のサイクル条件は推奨いたしません。
95℃, 5min.→（95℃, 10sec.→60℃, 20sec.→72℃, 30sec.）×45cycles）

【増幅曲線】



【融解曲線】

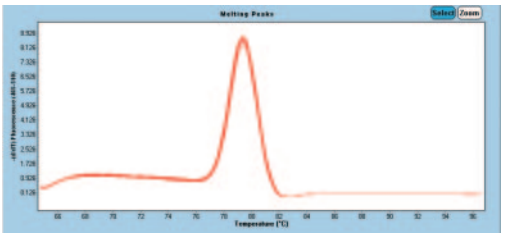


図4．GAPDHをターゲットとした5倍希釈系列の検出

品名および内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
TaqMan®アッセイ用 **THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix** ・THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix ・50× ROX reference dye	1ml×1本〔40回用〕	-20℃	QPS-101T	¥8,500
	1.67ml×3本〔200回用〕	-20℃	QPS-101	¥29,000
	（1.67ml×3本）×5〔1000回用〕	-20℃	QPS-101X5	¥133,000
SYBR® Green Ⅰアッセイ用 **THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix** ・THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix ・50× ROX reference dye	1ml×1本〔40回用〕	-20℃	QPS-201T	¥8,500
	1.67ml×3本〔200回用〕	-20℃	QPS-201	¥29,000
	（1.67ml×3本）×5〔1000回用〕	-20℃	QPS-201X5	¥133,000

※50× ROX reference dyeがマスターミックスとは別容器で供給されます。※包装の欄に記載の反応回数は、50μl反応時のものです。容量はqPCR Mixのみ示しています。
※大包装品（QPS-101X5およびQPS-201X5）は、QPS-101もしくはQPS-201の5セット組です。
※TaqMan®は、Roche Molecular Systems Inc.の登録商標です。　※SYBR®は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。
※QPS-101とQPS-201につきましては、高効率リアルタイムPCR用cDNA合成キット「ReverTra Ace® qPCR RT Kit」（Code No. FSQ-101）との以下のセット販売品もあります。
THUNDERBIRD® Probe qPCR/RT Set（Code No.QPS101/FSQ101、1セット、¥63,000）
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR/RT Set（Code No.QPS201/FSQ101、1セット、¥63,000）

免疫反応促進試薬*Can Get Signal*® immunostainを用いた内在性Rab11の検出

京都大学大学院　薬学研究科　生体情報制御学分野　高橋 千絵 先生

はじめに

私たちが研究対象としているRab11は、細胞表面からのエンドサイトーシスやその後のリサイクリングに重要な役割を果たす低分子量GTPaseであり、主としてリサイクリングエンドソームに局在します。しかしながら、蛍光免疫染色法に適した有用な抗体がなく、内在性Rab11の局在や、細胞内での機能を詳しく調べることが阻まれてきました。内在性Rab11の局在の検出が可能になれば、細胞生物学分野で研究が盛んな小胞輸送系、特にリサイクリングエンドソームの役割や機能の解明が飛躍的に進むと期待されます。そこで今回私たちは、免疫染色用免疫反応促進試薬「*Can Get Signal*® immunostain」を用いることによって、従来法では検出が難しかったRab11のシグナルの検出が可能かどうかについて検討しました。

方　法

1. 細胞

カバーグラス上でHeLa細胞を培養し、48時間後固定しました。(3.へ続く)

2. Rab11のノックダウン(siRNA)

35×35 mmディッシュでHeLa細胞を培養し、24時間後にRab11aおよびRab11bに対するsiRNAをトランスフェクションしました。その24時間後に細胞をカバーグラス上にまき直し、さらに48時間後(トランスフェクションの72時間後)に細胞を固定しました。(3.へ続く)

3. 固定

培地を除き、氷冷した10%トリクロロ酢酸で15分間浸して直ちに固定しました。PBSで3回洗浄後、0.1% TritonX-100/PBSで5分間処理した後、PBSで3回洗浄し、2% BSA/PBSで1時間ブロッキングしました。

4. 1次抗体反応

1次抗体を*Can Get Signal*® immunostain(Solution AまたはSolution B)　あるいはブロッキング液(2% BSA/PBS)で200倍希釈し、サンプルと4℃で一晩反応させました。反応後、PBSで3回洗浄しました。

1次抗体;抗Rab11モノクローナル抗体、マウス(BD Biosciences)

5. 2次抗体反応

ブロッキング液に2次抗体を1,000倍希釈、DAPI(5 mg/ml)を50,000倍希釈し、サンプルと室温で1時間反応させました。反応後、PBSで3回洗浄しました。

2次抗体;AlexaFluor® 488標識抗マウスIgG抗体(Molecular Probes®)
DAPI;4',6-diamino-2-phenylindole(Molecular Probes®)

6. 封入・観察

サンプルをFluorescent Mounting Medium(Dako)で封入し、蛍光顕微鏡観察をしました。顕微鏡はCarl Zeiss社製のAxiovert 200MATを使用しました。

結果及び考察

図は、抗Rab11抗体を2% BSA/PBS(従来法)、*Can Get Signal*® immunostain Solution A、またはSolution Bで希釈したときのRab11の染色像を比較しています。すべて同じ条件で撮影しました。Rab11のシグナルは、従来法ではほとんど検出できませんでしたが、*Can Get Signal*® immunostain Solution Aを使用した場合には、細胞質に散らばったエンドソーム様構造と核周辺から伸びたチューブル様構造のシグナルが認められました。このシグナルが示す局在は、細胞に外来性に導入したRab11と同様の構造にありました(data not shown)。また、このシグナルはsiRNAを用いたRab11ノックダウン細胞ではほぼ完全に消失しました。これらのことから、*Can Get Signal*® immunostain Solution Aにより検出が可能となったシグナルは、Rab11に特異的

であると結論づけられました。一方、*Can Get Signal*® immunostain Solution Bを使用した場合には、*Can Get Signal*® immunostain Solution Aを使用したときと同様のシグナルが弱いながら認められました。このシグナルもRab11ノックダウン細胞では消失しました。

Can Get Signal® immunostainを用いることによって、従来法では非常に難しかった内在性Rab11の局在を明らかにすることができました。HeLa細胞における内在性Rab11は、従来から示唆されていたエンドソーム様の局在に加えて、核周辺から伸びたチューブル様構造にも局在することが明確になりました。*Can Get Signal*® immunostainは、バックグラウンドを上げることなく、従来法では検出が難しかったシグナルを増強させました。抗Rab11抗体のようにシグナル検出感度の低い他の抗体においても大きな効果が期待できると思われました。

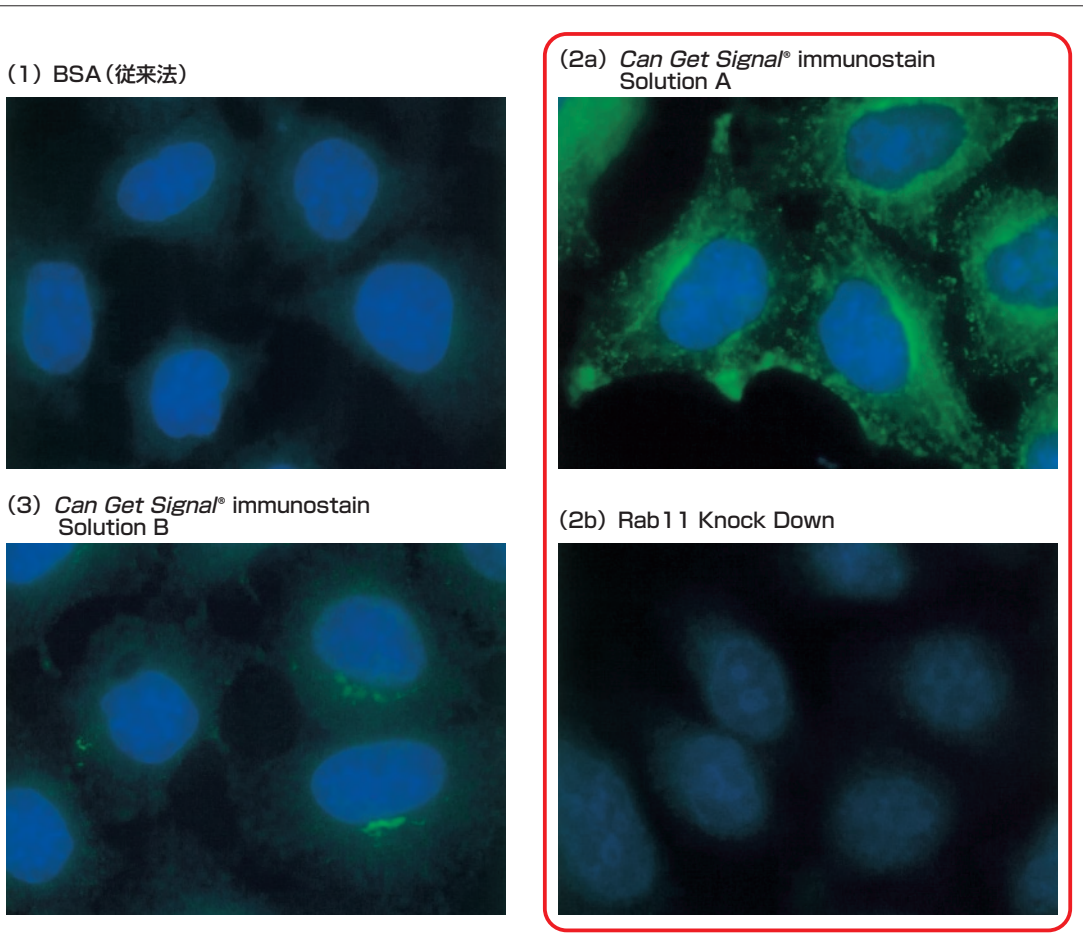


図. Rab11の検出

(1) 従来法
従来法でRab11を染色した結果。従来法ではRab11のシグナルはほとんど検出できませんでした。

(2a) *Can Get Signal*® immunostain Solution Aを使用
Can Get Signal® immunostain Solution Aを用いてRab11を染色した結果。細胞質に散らばったエンドソーム様構造と核周辺から伸びたチューブル様構造のシグナルが認められました。

(2b) siRNAを用いてRab11をノックダウンしたとき
Can Get Signal® immunostain Solution Aを用いて検出されたシグナルはほぼ完全に消失しました。

(3) *Can Get Signal*® immunostain Solution Bを使用
Can Get Signal® immunostain Solution Aと同様に、細胞質に散らばったエンドソーム様構造と核周辺から伸びたチューブル様構造のシグナルが認められたが、シグナルはSolution Aの場合に比べて極めて弱いものでした。

免疫反応促進試薬 ***Can Get Signal*® immunostain**

内容		Code No.	価格
Solution A&B	各5ml	NKB-401	¥12,000
Solution A	20ml	NKB-501	¥30,000
Solution A	(20ml ×1本)×4	NKB-501x4	¥70,000
Solution B	20ml	NKB-601	¥30,000
Solution B	(20ml ×1本)×4	NKB-601x4	¥70,000

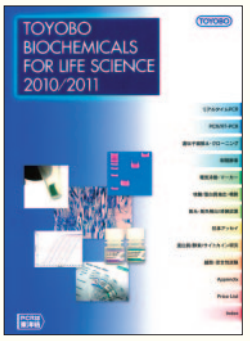
※0.2%以下のノニオン系界面活性剤を含みます。

Can Get Signal® immunostainは、免疫組織・細胞染色などの感度と特異性を改善する機能を有するバッファーです。
使用方法は、現在希釈液に用いている希釈血清やブロッキング溶液を本溶液に変更するだけです(Solution AとBは免疫反応の促進作用が異なり、両試薬ともに1次抗体および2次抗体にご使用いただけます)。

⇒詳しくはhttp://www.toyobo.co.jp/bioをご覧ください。

●新カタログ発刊のご案内

弊社総合カタログ 2010/2011、およびSanta Cruz Biotechnology社 カタログ2010を発刊いたしました。弊社ウェブサイト お問い合わせ・ご請求 のコーナーからご請求いただけます。



●価格改定のお知らせ

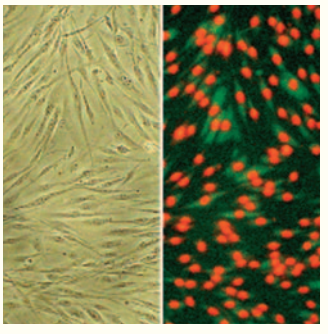
ご好評いただいております製品の一部につきまして、価格を改定させていただくこととなりました。引き続きご愛顧賜りますよう、お願いいたします。

＜保存温度：-20℃＞

品名および内容	包　装	Code No.	旧価格	新価格
高正確性PCR酵素 **KOD -Plus- Ver.2**	KOD-211	200U×1本	¥32,000	¥30,000
	KOD-211X5	(200U×1本)×5	¥128,000	¥120,000
KOD -Plus- Ver.2用Buffer	KOD-3B	1ml×1本	¥3,000	¥1,000
RNase活性阻害剤 **RNase Inhibitor (Native type)**	SIN-101	2,500U×1本	¥9,000	¥11,000
	SIN-101X5	(2,500U×1本)×5	¥36,000	¥44,000
RNase活性阻害剤 **RNase Inhibitor (Recombinant type)**	SIN-201	2,500U×1本	¥9,000	¥10,000
	SIN-201X5	(2,500U×1本)×5	¥36,000	¥40,000
高効率逆転写酵素 **ReverTra Ace®**	TRT-101	10,000U×1本	¥15,000	¥17,000
	TRT-101X5	(10.000U×1本)×5	¥60,000	¥68,000
	TRT-101X10	(10,000U×1本)×10	¥105,000	¥119,000

●初代細胞ロット情報配信のご案内

東洋紡ではCell Applications, Inc.(CAI)取扱い細胞のロット情報(年齢・性別・人種など)およびその在庫状況を毎月1～2回、メールアドレスを登録されたお客様にE-mailでお送りしております。特定の部位、性別、人種由来の細胞で実験をされたい場合、このリストの細胞を、Lot 指定でご注文いただくことが可能です。ご希望の方は、こちらのサイトにてご登録ください。



1 弊社ウェブページ (www.toyobo.co.jp/bio) → 2 お問い合わせ・ご請求 → 3 資料請求・情報配信依頼 → 4 CAI正常細胞ロット情報配信依頼

https://secure.toyobo.co.jp/bio01/html/cai/cai_form.html

※実験川柳特集 11

本コーナーは、弊社ウェブサイト（www.toyobo.co.jp/bio）「読者のコーナー」で最新の作品を確認いただけます。

DNA　どこに行ったと　叫ぶ友

匿名希望　シュウジ さん

●シュウジさんのコメント：普通の人が聞くとおかしい会話2

【句評】エタノール沈殿のお決まりパターンですね。でも、沈殿が見えなくても、意外と取れていることもありますよね。残念ながら、「普通の人が聞くとおかしい会話1」は不採用とさせていただきました。

闇の中　明日を照らす　WBバンド

匿名希望　透明人参 さん

●透明人参さんのコメント：現像前にウェスタンのバンドが光って見えるとホッとします。

【句評】ウェスタンブロット（WB）って工程が長いだけに検出のときにドキドキしますよね。実験の喜びを素直に表現した大変良い句だと思います。それにしても、化学発光って暗闇で目視できるほど光るものなのですか？

今はもう　つないだ日々が　懐かしい

匿名希望　B-boy さん

●B-boyさんのコメント：KOD FXなど高性能酵素が発売され、5キロ以上のクローニングも一回のPCRでできるようになって一言。

【句評】確かに、昔は短くPCRして、後でつないでいましたね。技術は日々進歩していますね。KOD FXを使っていただきありがとうございます。

泳動槽　感電だけは　マジ勘弁

匿名希望　しるおう さん

●しるおうさんのコメント：先日泳動槽からアガロースゲルを取り出そうとしたら、油断していて感電してしまいました。ホントに勘弁です。。。

【句評】私も経験あります～。本当にビックリしますよね。でも、DNAって、泳動中にあんなに電気を浴びているんですね（あまり深い意味はありません）。

⇒弊社ウェブサイト（読者のコーナー＞ご投稿コーナー）からご投句いただけます。

ご投句はこちらから　1 弊社ウェブページ（www.toyobo.co.jp/bio）　2 読者のコーナー　3 ご投稿コーナー

http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/lifescience/tech/reader/contribute/index.html

採用になった方には、￥2,000の図書カードと認定証をご進呈いたします（詳しくはサイトをご覧ください）。奮って投句ください。

ISO 9001 登録

東洋紡績株式会社の敦賀バイオ工場／敦賀バイオ研究所はLloyd,s Register Quality Assurance(LRQA)により日本はもとよりイギリス、アメリカ、オランダ、ドイツ、オーストラリアにおいてもISO 9001の認証登録されております。
本誌掲載の商品の内、本工場で製造されております制限酵素(Restriction Endonucleases)ならびに修飾酵素(Modifying Enzymes)は、品質マネジメント・システム沿って管理・運営・維持されております。

ISO 14001 登録

東洋紡績株式会社のつるが工場は環境マネジメントシステムに係る日本の認定機関である（財）日本適合性認定協会（JAB）に審査機関の認定を受けた日本検査キューエイ協会（JIC Quality Assurance Ltd.）によりISO14001の認証登録されております。東洋紡績株式会社敦賀バイオ事業所はつるが工場の環境マネジメントシステムの適用を受け活動を推進しており、敦賀バイオ事業所の製造するバイオ関連商品はISO14001の認証を受けた工場／研究所で開発、製造されています。

NOTICE TO PURCHASER : LIMITED LICENSE

●PCR関連商品のラベルライセンスについての詳細は、弊社ウェブサイト（www.toyobo.co.jp/bio）をご覧ください。

●本ページ掲載の試薬類は全て一般研究用の目的にのみ販売しており、医薬品、診断用医薬品、化粧品、食品用等には使用できませんので、十分ご注意ください。誤用による事故については、当社は一切の責任を負いません。
●本ページ掲載商品には消費税は含まれておりません。実際のご購入価格については弊社代理店へお問い合わせください。
●本ページ中の略号：毒 印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。劇 印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。危 印は消防法に基づく危険物です。